

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3456715号  
(P3456715)

(45) 発行日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)

(24) 登録日 平成15年8月1日 (2003. 8. 1)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
C 1 2 N 5/10  
// C 1 2 N 15/09

識別記号

F I  
C 1 2 N 5/00  
15/00

B  
A

請求項の数7 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平4-245206  
(22) 出願日 平成4年9月14日 (1992. 9. 14)  
(65) 公開番号 特開平7-177881  
(43) 公開日 平成7年7月18日 (1995. 7. 18)  
審査請求日 平成11年8月6日 (1999. 8. 6)  
(31) 優先権主張番号 7 5 9 5 5 8  
(32) 優先日 平成3年9月13日 (1991. 9. 13)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ECACC 9 0 0 5 1 0 0 1

(73) 特許権者 592195687  
バイオロジカル・リサーチ・センター・  
オブ・ザ・ハンガリアン・アカデミー・  
オブ・サイエンスーズ  
BIOLOGICAL RESEARCH  
H CENTER OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF  
SCIENCES  
ハンガリー人民共和国エイチ-6701 セ  
ゲド, ポスタフィオウク 521  
(74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔 (外2名)

審査官 七條 里美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の人工染色体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトDNAを含む安定な非二動原体染色体を含む非ヒト細胞系を製造する方法であり、  
ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に寄託番号90051001で寄託された細胞系EC3/7の細胞を、EC3/7細胞系の二動原体染色体中に存在するアミノグリコシド-3' ホスホトランスフェラーゼ-II遺伝子に対する選択剤を含む培地中で成長させるが、その際、選択剤は50%の細胞を殺傷する量の10倍より多い量で培地中に存在させ、  
培地中で生存する細胞を選択し、  
二動原体染色体を欠くが、ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に寄託番号90051001で寄託された細胞系中の二動

原体染色体に由来する動原体を含む安定な非二動原体染色体を含む、生存細胞またはその子孫の細胞をスクリーニングすることを含んでなり、選択剤の存在下で測定して細胞の少なくとも90%がミニクロモソームを保持するという安定した染色体維持を示すことを特徴とする方法。

【請求項2】 ヒトDNAを含む非二動原体染色体を含む非ヒト細胞系を製造する方法であり、  
ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に寄託番号90051001で寄託された細胞系の細胞を、第2の哺乳動物種の細胞と融合して融合細胞ハイブリッドを形成し、  
融合細胞ハイブリッドまたはそれらの子孫をスクリーニングして、二動原体染色体を欠くが、ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (EC

ACC)に寄託番号90051001で寄託された細胞系中の二動原体染色体に由来する動原体を含む安定な非二動原体染色体を含む細胞を選択することを含んでなり、選択剤の存在下で測定して細胞の少なくとも90%が、ミニクロモソームまたは齧歯類の染色体の平均的な大きさの染色体を保持するという安定した染色体維持を示すことを特徴とする方法。

【請求項3】 ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に寄託番号90051001で寄託された細胞系EC3/7中の二動原体染色体に由来する動原体およびヒトDNAを含む安定な染色体を含む細胞を含んでなる、請求項1または2に記載の方法によって製造される非ヒト細胞系。

【請求項4】 マウス・ハムスターハイブリッド細胞系である、請求項3記載の細胞系。

【請求項5】 動原体が、ヒトDNAを含み齧歯類の全長染色体の大きさである染色体上に存在する、請求項3記載の細胞系。

【請求項6】 マウスDNAおよびヒトDNAからなり、EC3/7細胞系中の最も小さい染色体の長さの半分より短いミニクロモソーム上に動原体が存在する、請求項3記載の細胞系。

【請求項7】 ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に寄託番号90051001で寄託された細胞系中の二動原体染色体に由来する動原体を含み、請求項3～6のいずれか1項に記載の細胞系から得られる、単離された染色体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は哺乳動物の人工染色体に関する。

【0002】

【従来の技術】 動原体 (セントロメア: centromere) は真核生物染色体の特異的な領域である。これは細胞分裂の際に正確な染色体分離が行われるようにする構造であるキネトコア形成がなされる部位である。さらに、真核生物染色体の高度な組織化において構造的役割を担っている可能性が示唆されている (Hadlaczky (1985), Internat'l. Rev., 94: 57-76)。

【0003】 動原体を単離し、クローニングすることは、その分子構造と機能を理解するためだけでなく、安定な人工染色体を作るためにも不可欠である。動原体に結合した遺伝子が存在する利点を生かして、下等真核生物 (酵母) の機能的動原体を単離することに成功している (Blackburn et al. (1984), Ann. Rev. Biochem., 53: 163-194; Clarke et al. (1985), Ann. Rev. Genet., 19: 29-56)。機能的動原体と、染色体末端を安定化するテロメアとの組み

合わせにより酵母の人工染色体を作成することが可能となった (Murray et al. (1983), Nature, 305: 189-193; Burke et al. (1987), Science, 236: 806-812)。これによって染色体の機能の研究と遺伝子操作に新しい時代が開かれた。

【0004】 酵母とは対照的に、高等真核生物 (哺乳動物など) は動原体の両側で境界を形成する反復DNA配列を含んでいる。ある種のタンパク質、特に動物の染色体中のタンパク質と相互作用するこの高度に反復的なDNAは、動原体周辺に遺伝的に不活性な領域 (ヘテロクロマチン) を作り出す。この中心周囲のヘテロクロマチンはあらゆる選択マーカー遺伝子をかなりの距離に保ち、それ故、反復DNAは染色体の "ウォーキング (walking)" による動原体配列の単離を妨げている。

【0005】 かくして、哺乳動物の人工染色体作成の要求が当業界に存在する。このような染色体を使用すれば、挿入変異の付随的な創出、導入されるDNAの大きさによる制限、及びプラスミドベクターの不完全な分離などを含む、哺乳動物細胞に遺伝子を導入するための既存の手法に固有な諸問題を克服することができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、哺乳動物の人工染色体の材料として使用できる細胞系を提供することにある。

【0007】 本発明の他の目的は、ヒトDNA配列を含む機能的動原体からなる細胞系を作成する方法を提供することであり、ここで動原体は染色体上に存在し、該染色体のすべての動原体は優性選択マーカーに結合したヒト配列からなる。

【0008】

【課題を解決するための手段】 ここに記載した、またその他の目的は以下に記載する1又はそれ以上の態様によって提供される。

【0009】 本発明の1態様においては、ヒトDNA配列を含む機能的動原体からなる非ヒト細胞系が提供され、ここで該動原体は染色体上に存在し、かつ該染色体のすべての動原体は優性選択マーカーに結合したヒト配列からなる。

【0010】 他の態様においては、ヒトDNAを含む機能的動原体からなる細胞系を作成する方法が提供され、ここで動原体は染色体上に存在し、かつ該染色体のすべての動原体は優性選択マーカーに結合したヒト配列からなっており、この方法は、ヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に寄託番号no. 90051001で寄託された細胞系の細胞を、優性選択マーカーのための選択剤を含む培地中で成長させ、ここで該選択剤は細胞の50%を殺す量の10倍以上で培地中に存在し、該培地中で生存する細胞

を選択し；生存細胞又はその子孫から二動原体染色体を欠いている細胞をスクリーニングする、ことからなる。

【0011】本発明のさらに他の態様においては、ヒトDNA配列からなる機能的動原体からなる細胞系を作成する方法が提供され、ここで動原体は染色体上に存在し、かつ該染色体のすべての動原体は優性選択マーカーに結合したヒト配列からなっており、この方法は、ヨーロッパ・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー（ECACC）に寄託番号no. 90051001で寄託された細胞系の細胞を、第2の哺乳動物種の細胞と融合させて融合細胞ハイブリッドを形成し；融合細胞ハイブリッド又はその子孫から二動原体染色体を欠いているはいるが、ヒトDNAからなる動原体を含む細胞をスクリーニングする、ことからなる。

【0012】これらの態様及びその他の態様については以下にさらに詳しく説明する。かくして本発明は哺乳動物の人工染色体として使用し得る細胞系を当業界に提供する。人工染色体は細胞系中で安定に維持され、所望の遺伝的要素のためのベクターとして用いるときに単離できる。

【0013】

【詳細な説明】一方の動原体がヒトDNA断片を含有する二動原体の染色体を有する細胞系を処理して、他の哺乳動物染色体から離れている染色体上にヒトDNAを有する動原体を単離することができることは、本発明において見いだされた。このことは、ヒトDNAを含有する動原体が機能的動原体である、ことを結論として示している。

【0014】ヒトDNAを有する機能的動原体は、ヨーロッパ・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー（ECACC）、英国、ポートンダウンに、ブダペスト条約に基づく条件で寄託番号90051001

（またEC3/7としても知られている）として寄託された細胞系から得られる。この細胞系は、一方の動原体がヒトDNA配列を含有している二動原体染色体を有するマウス細胞系である。この細胞系から単離できる動原体は優性な選択マーカーである、G418（シグマ社）に対する耐性を与えるアミノグリコシド-3'-ホスホトランスフェラーゼIに結合されている。細胞系EC3/7は比較的不均質であり、二動原体（85%）又はミニクロモソーム（10%）の何れかを有する。二動原体染色体の動原体及びミニクロモソームは抗動原体抗体による免疫染色では、正常なマウス動原体と区別できなかった。ミニクロモソームを持つ細胞は1回の細胞クローニングでは安定にクローニングできなかった。本発明以前には、ミニクロモソームは安定な複製を行うことができなかった。本発明は、クローニングされたヒトDNAからなる動原体のみを含有する染色体を、安定に複製する誘導細胞系を与える。

【0015】本発明により、2つのこのような誘導細胞

が提供される。1つの誘導細胞はEC3/7とチャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）細胞と融合することにより生成されたマウス/ハムスター融合細胞である。発明者は融合細胞系の生成の際又は後に、ヒト由来動原体の増幅を生じることを見いだした。げっ歯類動物の染色体のサイズであるにもかかわらず、増幅により、純粋なげっ歯類動物のものではない染色体を有する染色体を生じた。増幅された動原体（以下、 $\lambda$ neoと言う）は大部分の細胞において7倍存在した（表1）。増幅された動原体のうちのただ1つだけが細胞内において機能的であると思われる。

【0016】第2の誘導細胞は、EC3/7から誘導されたヒトDNA含有動原体からなる安定なミニクロモソームを有する。ミニクロモソームは細胞系内の最も小さい染色体の半分以下のサイズである。安定なミニクロモソームは高濃度の選択試薬中で、EC3/7のような二動原体染色体含有細胞を生育させることにより生成できる。この選択試薬は結合された配列と共に選択マーカーの増幅を誘導するものである。例えば、もしG418のような抗生物質の $10\mu\text{g}/\text{ml}$ が致死量であるとすれば（即ち、 $10^6$ 個の細胞の3週間の生存を阻止する）、増幅を選択するのに $400\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を使用できる。一般に、 $10^6$ 個の細胞を殺す量の少なくとも10倍、好ましくは20-40倍が望ましい。 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418におけるEC3/7細胞の選択によれば、二動原体染色体よりも、むしろ安定なミニクロモソームを持つ細胞が生成される。二動原体染色体の損失に関するスクリーニングは、抗動原体抗体による免疫染色と共に、標準的な細胞遺伝学的手法によって実施できる。本発明によれば、細胞系の少なくとも90%、好ましくは95%の細胞が染色体を保持する場合に、染色体は安定に維持される。安定性は選択試薬の存在においても維持されることが好ましい。また、安定な染色体は細胞培養の間にもその構造を維持し、染色体間及び染色体内の転移を生じない。

【0017】ミニクロモソームは、安定にこれを保持する細胞系の分裂細胞から物理的に単離される。ミニクロモソームは、分画遠心次いで蔗糖勾配沈殿により、部分的に精製できる。そのような方法により、約10-20%ミニクロモソームの調製物を生じる。

【0018】ミニクロモソーム（又はそれらの増幅誘導体）は染色体が媒介する遺伝子転移におけるベクターとして使用できる。哺乳動物細胞は、リン酸カルシウム、リボソーム、エレクトロポレーション、又は従来技術で知られているどのような手法を用いても、ミニクロモソーム又は遺伝子工学的に処理されたミニクロモソームで形質転換できる。ミニクロモソームは卵、胚又は培養細胞に微量注射するのにも使用できる。ミニクロモソーム含有細胞はヒト幹細胞又は骨髓細胞と融合するのにも使

用できる。その他の応用は当業者にとって、明らかであろう。

【0019】以下の実施例は本発明を記載された具体的な態様に限定するものでなく、発明を実施できる特定の方法を具体的に説明するために示される。

#### 【0020】実施例1

この実施例ではEC3/7細胞系の安定性について記載する。

【0021】単細胞由来の46個の独立したサブクローンを単離し分析した。各々のサブクローンは二動原体染色体を有していた。ミニクロモソーム含有細胞の割合はサブクローンにより異なり、2%ないし30%の間であった。本発明者は、専らミニクロモソーム中に付加的な動原体を有するサブクローンを単細胞サブクローニングによって単離することはできなかった。この結果は、ミニクロモソームが不安定であり二動原体染色体の規則的な切断による産物であることを示唆している。EC3/7細胞系をG418の高濃度（致死量の40倍）で350世代についてサブクローニングすることによって、ミニクロモソーム上にのみ特別の動原体を有する単細胞由来の安定な二つの細胞系（EC3/7C5及びEC3/7C6）を作った。抗動原体抗体を用いた間接的な蛍光抗体法とそれに引き続くインサイチュ・ハイブリダイゼーション実験によって、ミニクロモソームは二動原体染色体に由来することが立証された。双方の細胞系において、大部分のハイブリダイゼーション・シグナルはミニクロモソーム上に見いだされたが、CM8又はラムダ配列の痕跡は一動原体染色体の末端において検出された。EC3/7C5及びEC3/7C6細胞系（それぞれ140及び128個の分裂中期の細胞）において、二動原体染色体は一つも見られなく、ミニクロモソームはそれぞれ97.2%及び98.1%の細胞において検出された。そのミニクロモソームは150細胞世代以上にわたって維持された。テロメアDNA（telomeric DNA）の多数のコピーが、インサイチュ・ハイブリダイゼーションによって二動原体染色体のマーカー動原体領域において検出された。このことはマウスのテロメア配列が外来のDNA配列で共増幅（coamplify）されたことを示唆している。これらの安定なミニクロモソーム保持細胞系は、ヒトの配列を含有する特別な動原体が機能しており、そのミニクロモソームを維持する能力があるという直接的な証拠を提供する。

【0022】非選択的培地で46日間培養されたEC3/7細胞（103個の分裂中期の細胞）の免疫染色（immunostaining）による予備的分析によって、80.6%の細胞が二動原体染色体（60.2%）又はミニクロモソーム（20.4%）のいずれかを含有することが示された。続いてビオチン標識プローブを用いて行ったインサイチュ・ハイブリダイゼーションによって、付加された動原体中に“外来の”DNAが存在す

ることが立証された。これらの結果は、非選択的条件下でこの培養期間において、付加された動原体の重大な欠失も不活性化も起こらなかったことを示唆している。

#### 【0023】実施例2

この実施例ではEC3/7マウス細胞の種間（interspecific）融合とヒトの配列を有する安定な染色体の形成を立証する。

【0024】10%牛胎児血清（FCS）及び400μgのG418（Geneticin, SIGMA社）を加えたF12培地中でEC3/7マウス繊維芽細胞（fibroblast）細胞系を単層として培養した。チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO K-20）を10%FCS加F12培地中で培養した。ポリエチレングリコールを用いて $1.8 \times 10^7$ のCHO細胞と $2.3 \times 10^6$ のEC3/7細胞を融合させた（Davidson, *Som. Cell Genet.*, vol. 2, pp. 165-176 (1976)）。10%FCS及び400μgのG418を含むF12HAT培地（Szybalski, *N. C. I. Monogr.*, vol. 7, pp. 75-89 (1982)）中でハイブリッドが選択された。

【0025】LMTK EC3/7マウス細胞とCHO K-20ハムスター細胞との融合によって幾つかのハイブリッド細胞系が得られた。EC3/7細胞は、大多数の細胞において二動原体染色体又は頻度はより少ない（10%）がミニクロモソーム上で優性な選択可能遺伝子（neo）と結合している機能的なマーカー動原体を有していた。ハイブリッドは400μgのG418（Geneticin, SIGMA社）を含むHAT培地上で選択され維持された。独立したハイブリッド系の細胞学的分析の間に、上述したヒトの抗動原体血清（LU851）を用いた間接的な蛍光抗体法とそれに続くビオチン標識ラムダDNAプローブを用いたインサイチュ・ハイブリダイゼーションによって、neo結合マーカーをモニターした。9個のハイブリッドクローンが特別のマーカー動原体を有する二動原体染色体を保持していた。一つのハイブリッド系（KE12/4）においては、 $10^7$ 細胞期（融合の65日後）に、マーカー動原体が二動原体染色体から離脱して新たな染色体が形成された。その染色体は平均的なマウス染色体の大きさを有していた（1図）。ビオチン標識ラムダDNAプローブを用いたインサイチュ・ハイブリダイゼーションは、新たに形成された（λneo）染色体上に極度のハイブリダイゼーション・シグナルを示した（1B図）。λneo染色体上のインサイチュ・ハイブリダイゼーションの結果は、この染色体が二動原体染色体のマーカー動原体領域（neo配列を保持している領域）から得られたものであることを明確に表している。

【0026】λneo染色体はこの細胞系において全く安定であることが見いだされた。培養後65日たって

( $10^7$ 細胞期)、分析された96個の分裂中期の細胞のうち92個が $\lambda$ neo染色体の存在を示した。三つの分裂中期の細胞は $\lambda$ neo染色体セグメントの転移(translocation)を示し、一の分裂中期の細胞においてはこの染色体は全く検出されなかった。培養後110日たつと、98%を越える細胞(167個の分裂中期の細胞を分析)が $\lambda$ neo染色体を保持していた。KE12/4細胞を更に43日間(>50世代)非選択的な条件下(HAT<sup>-</sup>, G418<sup>-</sup>)で培養したところ、84.4%の細胞(96個の分裂中期の細胞を分析)が $\lambda$ neo染色体を持ち続けた。

#### 【0027】実施例3

本実施例は、 $\lambda$ neo染色体の特徴について記述する。

【0028】グラハム(Graham)ら(Virology, vol. 52, pp. 456-467, 1973)により記載されたとおりに、ピオチン標識プローブを用いてインサイチュ・ハイブリダイゼーションを実施した。二重インサイチュ・ハイブリダイゼーションを以下のとおりに実施した。第一のハイブリダイゼーション後、分裂中期の写真を撮り、カバースリップをはずしてスライドをPBSで洗浄した。ぬれたスライドを70%ホルムアミド(BDH Analyt. Reagent) / 2×SSC中で72℃において5分間変成し、二次ピオチン標識プローブを用いて標準的ハイブリダイゼーション法(グラハム(Graham)、上記)を行った。インサイチュ・ハイブリダイゼーション実験は、散在したneoの存在(図1B)およびヒト(図1H) DNA配列を示す。この発見は、 $\lambda$ neo染色体が広範囲な増幅工程により形成されたことを示唆する。慣用的な細胞学においても、インサイチュ・ハイブリダイゼーションにおいても、KE12/4細胞系における染色体外構造は検出されなかった。

【0029】テロメアは染色体の安定性に必要であると考えられるので、テロメア配列が $\lambda$ neo染色体内に存在するの否かという疑問が持ち上がった。この疑問に答えるために、テロメア反復配列(TTAGGG)<sub>n</sub>を用いてインサイチュ・ハイブリダイゼーションが実施されたが、該反復配列は脊椎動物において共通である(メイネ(Meyne)ら、Chromosoma, vol. 99, pp. 3-10, 1990)。テロメア配列とハイブリダイズする配列が、 $\lambda$ neo染色体全体を通して散在することが見いだされた(図1D)。さらに、TTAGGG反復配列に富んだ幾つかのハムスター染色体の中心周囲領域にわたって強いラベリングが検出された(メイネ(Meyne)ら、上記)。“親の”EC3/7分裂中期におけるハイブリダイゼーションにより、TTAGGG反復配列の起点(origin)が明らかにされた。マーカー動原体が位置する、二動原体染色体の完全に末端の動原体領域が、ピオチン標識テロメアプローブとの強いハイブリダイゼーションシグナルを示し

た(図1E)。このことは、二動原体染色体のマーカー動原体領域が形成されたときの第一の増幅の間、ヒト( $\lambda$ CM8)とneo配列( $\lambda$ gtWESneo)でテロメア配列が共に増幅することを示唆している。

【0030】他の反復配列が $\lambda$ neo染色体の形成に関与しているか否かを試験するために、ピオチン標識された全マウスDNAプローブおよび全ハムスターDNAプローブをインサイチュ・ハイブリダイゼーションに使用した。全ハムスターDNAプローブを用いた場合、 $\lambda$ neo染色体上にシグナルは見いだされなかった。マウスプローブを用いると、マウス染色体の中心周囲領域が強いハイブリダイゼーションを示し、そして明確なハイブリダイゼーションパターンが $\lambda$ neo染色体上で検出された。一定の細いバンドが $\lambda$ neo染色体に沿って観察された(図1F)。これらの結果が示すことは、二動原体染色体からマーカー動原体を分離する分断が、隣接するマウス動原体の中心周囲領域において生じたことである。 $\lambda$ neo染色体の形成に通じる増幅工程の間、この反復マウスDNAは大きいアンプリコン(増幅されたユニット)(>10Mb)と近似した。

【0031】マウス線維芽細胞をDNA結合性染色剤ヘキスト33258の存在下に培養すると、分裂中期染色体の中心周囲のヘテロクロマチンの目立った不完全凝縮(undercondensation)が生じる(ヒルウィグ(Hilwig)ら、Exp. Cell Res., vol. 81, pp. 474-477 (1973))。この技術をKE12/4細胞系に使用することにより、我々は $\lambda$ neo染色体の縦の分割を観察することを期待した。これが、不完全凝縮した染色体において生じたインサイチュ・ハイブリダイゼーションにより明らかにされたよりもさらに詳細な染色体構造を提供するものであることを、我々は期待した(図1F)。

【0032】ヘキスト染色剤33258を処理された $\lambda$ neo染色体は、マウス反復配列中のハイブリダイズするバンドに対応した領域の一定の不完全凝縮を示したが(図1G)、このことは、これらが中心周囲の起点(origin)を有することを示唆する。マウス中心周囲のヘテロクロマチンの主要DNA成分が主要なサテライトDNAであることは前に報告されている(ワング(Wong)ら、Nucl. Acids. Res., vol. 16, pp. 11645-11661 (1988))。ピオチン標識マウス主要サテライトプローブ(ドクター、ラトナー(J. B. Rattner)により供与された)を用いたインサイチュ・ハイブリダイゼーションパターンは、全マウスDNAプローブにより検出されたパターンと区別のつかないものであり(図1F)、このことはアンプリコンのヘリがマウス主要サテライトDNAに富んでおり、マウス中心周囲ヘテロクロマチンとしてふるまうことを示している。

【0033】ヘキスト染色剤33258により誘導され

た $\lambda$ neo染色体のある領域の不完全凝縮によって、この染色体の詳細な構造上の特徴を明らかにすることもまた可能となった。

【0034】1. 最初に細胞の増殖段階が $10^7$  (65日培養)の時に検出されたアンブリコン数は、ある程度の一致性を示していた。65.6%の細胞において、アンブリコン数は7であった。アンブリコン数におけるこの一致性は、110日培養後にわずかに増加しており

(分析した細胞分裂中期の細胞1500個のうち73.2%)、非選択培養条件下において維持された(43日間)。254日培養後においては、アンブリコン数が7である $\lambda$ neo染色体の数は80%に達した(表1)。

【0035】2. ある特定の $\lambda$ neo染色体のアンブリコンは、種々の大きさであったが、それぞれの細胞においてはある特定のアンブリコンの大きさは一定に保たれていた。この知見は $\lambda$ neo染色体の「マッピング」を可能にした。すなわち、2つの同様の大きさのブロック

(a及びb)と2つの大きなユニット(c及びd)、及び3つの小さなアンブリコン(e、f及びg)によって染色体が完成する(図2A)。

【0036】3. アンブリコン中の少量のマウス大(major)サテライト配列は、「2次圧縮(secondary constrictions)」を生成することができ、従って、よく広がり引き伸ばされた染色体のより詳細な構造を可視化することができる。2次圧縮によって、c及びdユニットは分割して同等でない部分となり、これらのアンブリコンは鏡像対称であった(図2A)。このことはアンブリコンcがアンブリコンdに対して逆方向になっていることを示唆した。

【0037】4. 抗動原体血清を用いた間接免疫蛍光法によって、機能的動原体はアンブリコンaに存在することが示された。

【0038】

【表1】

254日培養後の $\lambda$ neo染色体のアンブリコン数

アンブリコン数	細胞数	%
3	1	0.27
4	2	0.53
5	9	2.40
6	7	7.20
7	300	80.00
8	10	2.66
9	3	0.80
10	2	0.53
11	1	0.27
12	0	0.00
13	1	0.27
転移	19	5.07
合計	375	100.00

ヘキスト33258で染色処理したKEI2/4の細胞分裂中期の細胞を、カルボルフクシンで染色し、光学顕微鏡で分析した。「転移(translocation)」とは、 $\lambda$ neo染色体の全体又はその断片がマウス又はチャイニーズハムスターの染色体に転移していることを示す。391個の細胞分裂中期の細胞中16個において、 $\lambda$ neo染色体が見い出されなかった。

【0039】5. ヘキスト染色処理及びカルボルフクシン染色した細胞分裂中期の細胞数千個中、7個より少ないか又は多いアンブリコンを有する $\lambda$ neo染色体が多く見いだされた。これらの染色体のほとんどが末端アンブリコンe、f及びgを含んでいた(図2B)。免疫染色およびヘキスト33258処理した細胞分裂中期の細胞を数百個分析したところ、動原体が末端以外に位置している $\lambda$ neo染色体は1つも見い出されなかった。これらの観察は、 $\lambda$ neo染色体の伸長が染色体の腕において生じており、染色体の末端において生じるのではないことを示唆している。

【0040】6. 約7500個の $\lambda$ neo染色体のうち8個が姉妹染色分体間で異なるアンブリコン数を示していた(図2C)。しかし、すべての場合において両方の染色分体に末端アンブリコンが存在していた。

【0041】7. ヘキスト染色処理した $\lambda$ neo染色体を、ヒト(CM8)DNAをプローブとしてインサイチュ・ハイブリダイゼーションしたところ、不完全凝縮領域は標識されないことが示された(図1H)。

【0042】近年、ワン(Wong)とラトナー(Rattner)はマウスの小(minor)サテライトDNAがすべてのマウス染色体の動原体に特異的に位置していることを示した(Wong, et al., supra)。同じDNAプローブを用いたところ、EC3/7細胞の染色体の、マーカー動原体を除くすべての動原体がハイブリダイズした。KEI2/4細胞においても同様の結果が見られた。マウス動原体をプローブとしたところ、動原体に強いハイブリダイゼーションが検出されたが、 $\lambda$ neo染色体の動原体はハイブリダイズ

しなかった(図3B)。λneo染色体を同定するために、二重インサイチュ・ハイブリダイゼーションを行った。同じ染色体調製物についてλDNAプローブを用いて再びハイブリダイゼーションを行った(図3C)。

【0043】小サテライトDNAプローブを5倍量(2.8μg/ml)用いたところ、λneo染色体においてハイブリダイゼーションのバンドが見られ(図3E、F)、これはマウス大サテライト配列の位置に対応していた(比較のために図1Fを参照のこと)。この弱いハイブリダイゼーションは、マウス小サテライトプローブと大サテライト配列のクロスハイブリダイゼーションに起因したものであり得る。これらの配列はある領域で有意な相同性を示すからである(Wong, et al., *supra*)。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、抗動原体抗体によるKE1 2/4細胞の免疫染色及びビオチン標識DNAプローブによるKE1 2/4及びEC3/7細胞のインサイチュ・ハイブリダイゼーションを示す生物の形態写真である。染色体はヨウ化プロビジウムで対比染色した。

パネルA: 抗動原体血清(LU851)によるKE1 2/4分裂中期の細胞染色体の間接的免疫蛍光染色。

パネルB: 続いて行ったビオチン化ラムダDNAプローブによるインサイチュ・ハイブリダイゼーション後の同じ分裂中期の細胞。

パネルC: neoによるインサイチュ・ハイブリダイゼーション。

パネルD: テロメアプローブ、矢印はλneo染色体を示す。

パネルE: テロメアプローブによるEC3/7分裂中期の細胞のインサイチュ・ハイブリダイゼーション。矢印は二動原体染色体を示す。

パネルF: 全マウスDNAプローブによるKE1 2/4染色体のインサイチュ・ハイブリダイゼーションであって、マウス染色体の中心周囲領域の強いラベルと、λneo染色体上のバンド状のパターンを示す。

パネルG: ヘキスト染色剤33258で処理したKE1

2/4染色体のカルボルフクシン染色による分裂中期の細胞。

パネルH: ビオチン標識ヒト(CM8)DNAによるヘキスト染色剤33258で処理したKE1 2/4分裂中期の細胞プレートのインサイチュ・ハイブリダイゼーション。矢印はλneo染色体を示す。

【図2】図2は、ヘキスト染色剤33258で処理したλneo染色体の構造を示す生物の形態写真である。aからgは個々のアンブリコンを示す。

パネルA: 4個の異なる分裂中期の細胞からのλneo染色体の”アンブリコンマップ”。模式図では動原体の位置はccで示され、c及びdの”2次圧縮”はscの記号で示す。

パネルB: 種々のアンブリコン数によるλneo染色体であって、末端アンブリコンの存在を示す。

パネルC: 姉妹染色分体間で異なるアンブリコン数を示すλneo染色体。矢印は対にならないアンブリコンを示す。

【図3】図3は、免疫染色及び二重インサイチュ・ハイブリダイゼーションによるKE1 2/4染色体の動原体の検出を示す生物の形態写真である。染色体はヨウ化プロビジウムで対比染色した。

パネルA: 抗動原体血清によるヘキスト染色剤33258で処理したKE1 2/4染色体の免疫染色。矢印は末端動原体を有するλneo染色体を示す。

パネルB: 同じ分裂中期の細胞のDNA染色。

パネルC: マウスの小サテライトDNAプローブ、及び次いでラムダDNAプローブで行ったKE1 2/4染色体のインサイチュ・ハイブリダイゼーション。

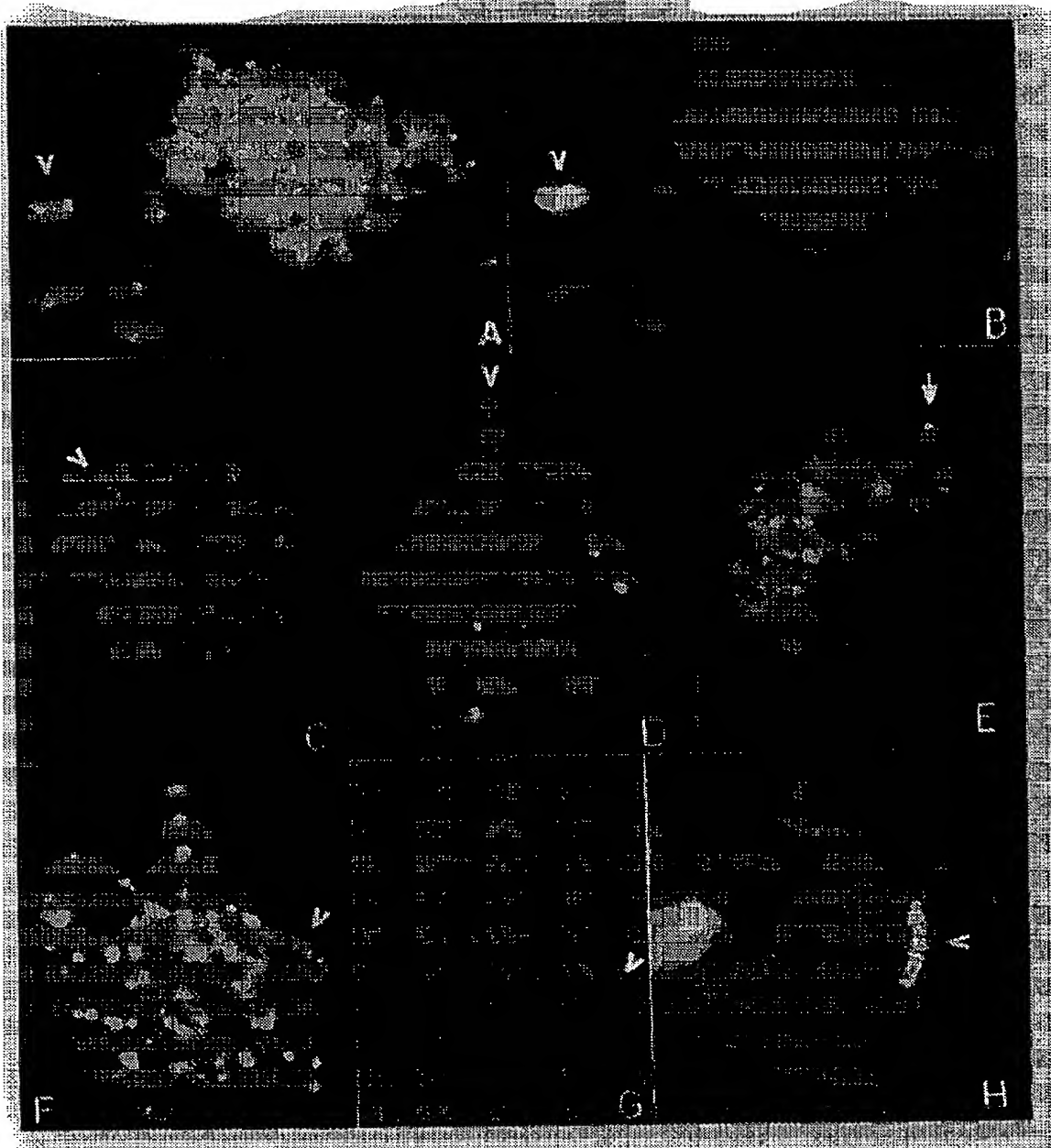
パネルD: 矢印はλneo染色体を示す。

パネルE: パネルCと同じであるが、5倍のマウス小サテライトDNAプローブを用いた。λneo染色体の弱いバンド状ハイブリダイゼーションパターンに注意(矢印)。

パネルF: 次いで同じ分裂中期の細胞をラムダDNAプローブで行ったハイブリダイゼーション。

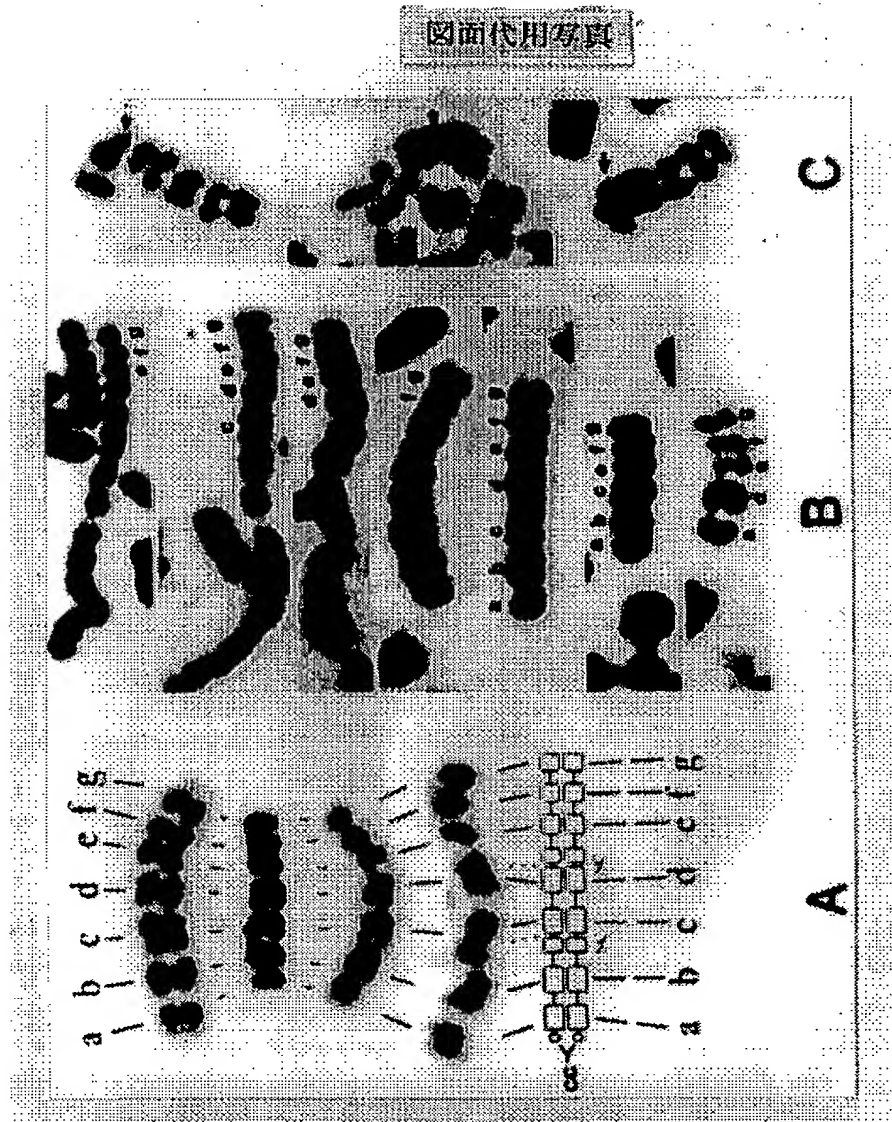
【図1】

図面代用写真



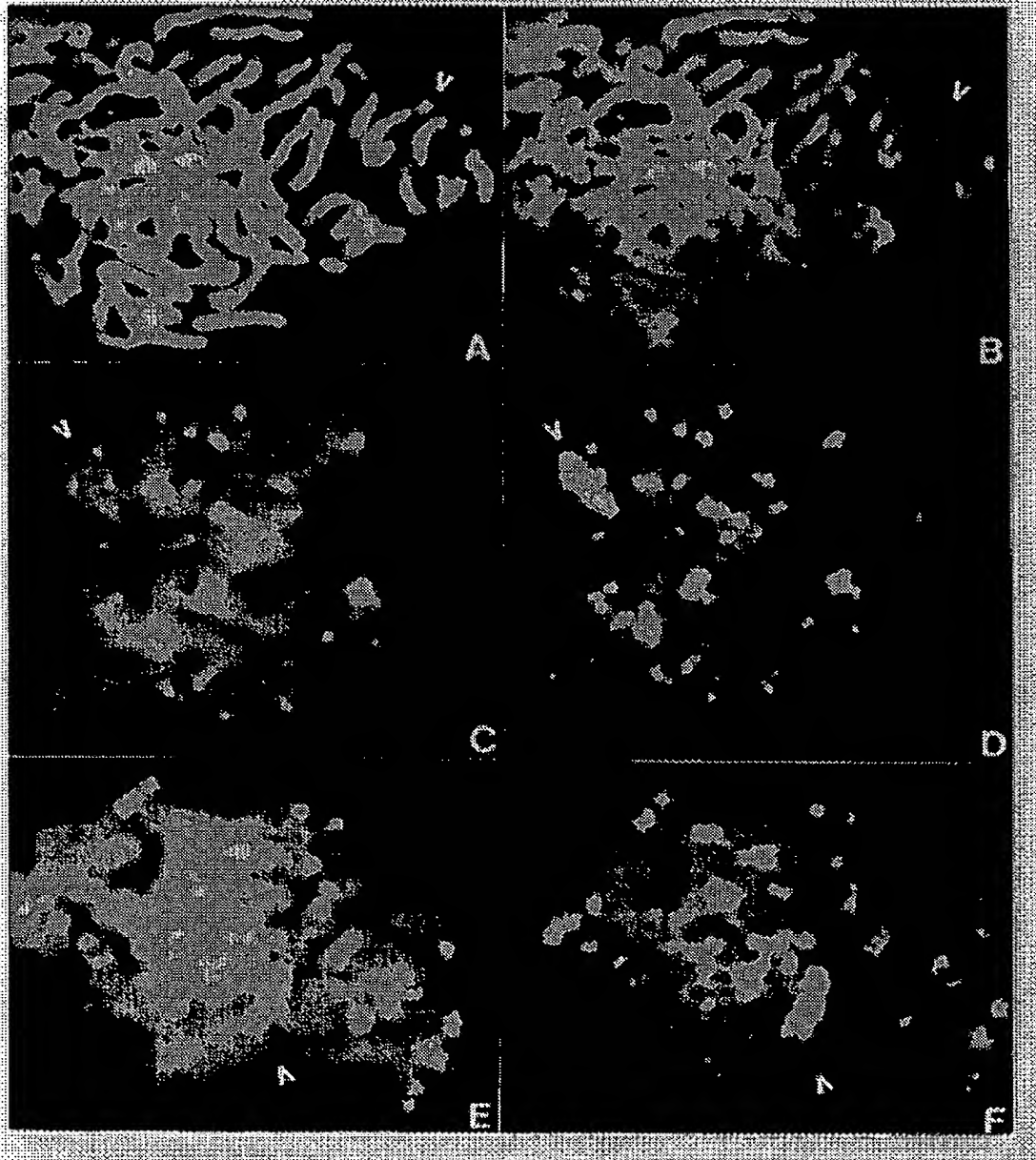


【图2】



【图3】

図面代用写真



フロントページの続き

(72)発明者    ジューラ・ハドラツキー  
                 ハンガリー人民共和国エイチ-6723 セ  
                 ゲド, セモス   ウーツカ・1/エイ   ア  
                 イエックス・36

(56)参考文献    特開   平6-121685 (J P, A)

(58)調査した分野(Int. Cl.<sup>7</sup>, D B名)  
                 C12N    5/00 - 5/28  
                 B I O S I S / W P I ( D I A L O G )  
                 P u b M e d